



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010/2012

**Letícia Novaes Duarte Ensaio de Hibridação em Sanduíche na
Deteção de Fungos**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010/2012

**Letícia Novaes Duarte Ensaio de Hibridação em Sanduíche na
Deteção de Fungos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Newton Carlos Marcial Gomes, Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

O Juri

Presidente

Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso,
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia,
Universidade de Aveiro

Vogais

Newton Carlos Marcial Gomes,
Investigador Auxiliar, CESAM & Dep. de Biologia,
Universidade de Aveiro (Orientador)

Alisa Rudnitskaya,
Investigador Auxiliar, CESAM & Dep. de Química,
Universidade de Aveiro (Arguente)

Agradecimentos

A conclusão desta Dissertação de Mestrado só foi possível pela intervenção, direta e indireta, de algumas pessoas, a quem agradeço com imenso carinho:

Ao Doutor Newton Gomes, pelo apoio, pela confiança em meu trabalho e por aguçar meu gosto pela Biologia Molecular.

Ao Mestre Francisco Coelho, pela co-orientação e imensa ajuda prestada, além da calma transmitida nos momentos mais difíceis.

A Doutora Alisa Rudnitskaya, pela assistência relativa aos métodos potenciométricos.

A Mestre Catarina Prata pela revisão ortográfica geral.

À Doutora Amparo Faustino (Departamento de Química) e ao Doutor Manuel Santos (Departamento de Biologia), e suas respectivas alunas, Dora e Marina, por disponibilizar e auxiliar o uso dos espectrofluorímetros.

Aos projetos de pesquisa QREN nº 1561 e AQUASAFE (Desenvolvimento de novas tecnologias para antecipar e diagnosticar surtos de doenças na aquacultura) no âmbito do PROMAR e do Fundo Europeu das Pescas pelo financiamento desta tese.

Aos colegas do LEMAM, em especial às Marias, todas vocês foram muito mais do que colegas. Obrigada!

Dedico este trabalho à meus pais e irmão pelo incondicional apoio e oportunidade concedida.

Palavras-chave

ensaio de hibridação em sanduíche (SHA), detecção, fungos, sensibilidade, RNA

Resumo

A detecção precoce de contaminantes microbianos é essencial para evitar sua disseminação, no entanto a maioria das análises clássicas são lentas, inespecíficas, e limitadas a microrganismos cultiváveis. Tendo em conta estas dificuldades, têm sido desenvolvidas diversas técnicas para quantificar comunidades microbianas em um menor espaço de tempo. Métodos moleculares são os mais indicados, porém não são totalmente aceites para uso rotineiro por necessitarem de reagentes e equipamentos dispendiosos e profissionais experientes. Assim, o ensaio de hibridação em sanduíche para uma quantificação rápida, simples e barata de fungos foi avaliado. O objetivo foi otimizar as condições deste método visando obter uma resposta mais sensível a já descrita anteriormente para este grupo de organismos. Neste método duas sondas hibridam com o RNA alvo e os sanduíches formados produzem um sinal fluorescente quantificável. Isto ocorre porque a sonda de captura imobiliza somente o RNA hibridado, desta maneira é feita a lavagem das sondas restantes e dos RNA não-alvo. Só então é adicionado o substrato que reagirá enzimaticamente com o complexo enzima-anticorpo-DIG ligado à sonda de detecção, desta maneira o sinal produzido será equivalente à quantidade de RNA alvo da amostra em questão. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi selecionada como alvo para este estudo por ter suas características bastante conhecidas e ser um ótimo organismo modelo para eucariotos. Diversas concentrações de células foram utilizadas nos ensaios onde o limite de detecção foi de 10^4 células/ml.

Keywords

sandwich hybridization assay (SHA), detection, fungi, sensibility, RNA

Abstract

Early detection of contaminants is essential to prevent its spread, but most analyzes are still slow, nonspecific, and limited to cultivable microorganisms. Given these difficulties, several techniques have been developed to quantify microbial communities in a shorter time. Molecular methods are suited, but not fully accepted for routine use because it requires expensive reagents and equipment and experienced professionals. Thus, the sandwich hybridization assay for quick, simple and inexpensive fungi quantifying was evaluated. The objective was to optimize this method to obtain a more sensitive signal to previously described for this group of organisms. In this method two probes hybridize to the target RNA and the sandwiches produced a measurable fluorescent signal. This is because the capture probe immobilizes only the hybridized RNA, in this manner the probes and the others non-target RNA are washed. Then is added the substrate which will react with the enzyme-linked with the DIG detection probe, the signal produced in this way is equivalent the amount of target RNA in the sample in question. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was selected as a target for this study by having their features well known and be an excellent model organism for eukaryotes. Various cell concentrations were used in tests where the detection limit was 10^4 cells/ml.

Lista do Conteúdo

Índice	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas e Gráficos	xi
Lista de Acrónimos e Abreviaturas	xii
1. Introdução	13
1.1 Métodos de Detecção de Microrganismos	15
1.2 Detecção por Hibridação em Sanduíche	16
1.3 Detecção de fungos patogénicos – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	18
1.4 Motivação e Objetivos	18
2. Materiais e Métodos	21
2.1 Cultura, Diluição e Quantificação Celular	23
2.2 Extração e Quantificação de RNA	24
2.3 Ensaio de Hibridação em Sanduíche (SHA)	27
2.3.1 Sondas	27
2.3.2 Hibridação	28
2.3.3 Captura	29
2.3.4 Detecção	30
2.4 Análises Estatísticas	31

3. Resultados	33
3.1 Escolha do método de extração de RNA	35
3.2 Validação das diluições	35
3.3 Escolha das Sondas	37
3.4 Otimização da Temperatura de Hibridação	38
3.5 Sensibilidade de Detecção	38
3.6 Análise dos resultados do SHA por Qubit®	40
4. Discussão	43
5. Conclusão	51
6. Perspetivas Futuras	55
7. Referências Bibliográficas	59

Lista de Figuras

Figura 1 - Princípio do ensaio de hibridação em sanduíche. Na solução de hibridação a sonda de captura marcada com biotina e a sonda de detecção com digoxigenina (DIG) são as primeiras hibridadas com o RNA alvo (a) seguido por imobilização híbrida de esferas magnéticas e enzima de detecção fosfatase alcalina conjugada com anti-DIG (b), a fosfatase alcalina cliva BBTP (2'-[2-benzotiazolil]-6'-hidroxibenzotiazol fosfato, Attophos®) para fosfatase inorgânica (Pi) e BBT (2'-[2-benzotiazolil]-6-hidroxibenzotiazol), gerando fluorescência. Fonte: RAUTIO et al. (2003).

- 16 -

Figura 2 - Demonstração de uma diluição seriada típica. Fonte: (BRADY), modificado por JBM (2008).

- 23 -

Figura 3 - Exemplos de padrões de contagem que podem ser adotados.

- 24 -

Figura 4 - Extração de células de *Saccharomyces cerevisiae* da superfície do meio de cultura, com palitos estéreis (a) e diluídas em Solução de Ringer (b).

- 26 -

Figura 5 - Demonstração de 0.5g de esferas de vidro em tubos de 2ml (a), para rompimento das células de levedura de diferentes diluições em homogeneizador FasPrep® (b).

- 27 -

Figura 6 - Esquema das sondas modificadas testadas e seus respectivos tamanhos em pares de base. Legenda: EF3, sonda de detecção; FR1, sonda de captura; MY1574, sonda de captura; bp, pares de base.

- 28 -

Figura 7 - Representação esquemática da hibridação do RNA alvo, que ocorre a 50 °C por 30 minutos. Fonte: Rowan et al. 2005, modificado. Legenda: DIG, digoxigenina ligado a sonda de detecção; B, biotina ligada a sonda de captura; RNA, RNA alvo.

- 29 -

Figura 8 - Representação esquemática da captura do RNA alvo hibridado imobilizado em uma fase sólida durante as lavagens. Fonte: Rowan et al. 2005, modificado. **- 30 -**

Figura 9 – Representação esquemática do produto hibridado ligado ao anticorpo anti-DIG, rotulado com a enzima fosfatase alcalina, que reage com o substrato produzindo sinal proporcional ao número de hibridados (RNAs alvo) presentes em cada amostra. Fonte: ROWAN et al. (2005), modificado. Legenda: AP, enzima fosfatase alcalina conjugada com anti-digoxigenina; AttoPhos[®], substrato fluorescente. **- 31 -**

Figura 10 - Esquema proposto para o ensaio em sanduíche com detecção potenciométrica das hibridizações. Fonte: (RAUTIO et al., 2003), modificado. Legenda: AgNP, nanopartícula de prata. **- 57 -**

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1 - Total de RNA de células de *S. cerevisiae*, em µg/ml, após extração por três métodos diferentes, com quantificação realizada através de Qubit® Quantification Platform (Invitrogen). - 35 -

Tabela 2 - Comparação numérica do total de células e da quantidade de RNA por mililitro de cada amostra. - 36 -

Tabela 3 - Comparação das sondas testadas para a detecção de RNA de fungos a partir do método de hibridação em sanduíche. - 37 -

Tabela 4 – Sequências das sondas utilizadas para detecção de RNA de fungos através do ensaio de hibridação em sanduíche, onde a sonda de captura foi modificada com uma molécula de biotina e a sonda de detecção foi posteriormente rotulada com uma digoxigenina. - 38 -

Gráfico 1 - Comparação gráfica do número de células por mililitro e da quantidade de RNA (µg/ml) de cada diluição. - 36 -

Gráfico 2 – Representação gráfica dos valores de fluorescência ajustada (RFU – Relative Fluorescence Unit), mensurados no fluorímetro 1. - 39 -

Gráfico 3 - Representação gráfica dos valores de fluorescência ajustada (RFU – Relative Fluorescence Unit), mensurados no fluorímetro 2. - 40 -

Gráfico 4 - Representação gráfica da quantidade de rRNA analisada por Qubit® após o ensaio de hibridação em sanduíche. - 41 -

Gráfico 5. Representação gráfica dos valores obtidos de diversas concentrações de AgNP através de avaliação potenciométrica. - 57 -

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Grau Celsius
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio Enzimático Imunoabsorvente
FISH	Hibridação Fluorescente <i>in situ</i>
g	Grama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/s	Metro por Segundo
nm	Nanómetro
PCR	Reação em Cadeia Polimeráse
pH	Potencial Hidrogeniónico
Pi	Fosfatase Inorgânica
PVP	Polivinilpirrolidona
Rpm	Rotação por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossómico
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
SHA	Ensaio de Hibridação em Sanduíche
SSC	Tampão Salino, Citrato de Sódio

1. Introdução

1. Introdução

Os fungos constituem um grande grupo heterogéneo de organismos, que podem ser encontrados, virtualmente, em todos os nichos ecológicos. O facto de ser um grupo tão heterogéneo, ao nível de comportamento e organização celular, torna a sua identificação difícil e restrita a um grupo de estudiosos, que se dedicam às questões da micologia. Atualmente, o conhecimento da sua biologia molecular tem iniciado uma nova era na classificação e deteção deste grupo biológico (MACHADO, 2006).

1.1 Métodos de deteção de microrganismos

A deteção de contaminantes numa fase inicial do processamento dos alimentos na indústria é essencial para evitar o risco de transferência de organismos patogénicos para as fases seguintes do processo industrial. Geralmente, a deteção de contaminação por microrganismos patogénicos é feita através da cultura dos mesmos, seguida de identificação através de microscopia ótica. No entanto, estes métodos são lentos, inespecíficos, e estão limitados a microrganismos cultiváveis. No caso dos fungos, a baixa resolução do microscópio ótico, pode constituir um problema adicional, já que pode não mostrar detalhes importantes das estruturas fúngicas, que permitem a identificação dos microrganismos (HUHTAMELLA et al., 2006, SPERANZA et al., 2010).

Tendo em conta estas dificuldades, têm sido desenvolvidas várias técnicas para quantificar comunidades microbianas em amostras ambientais e/ou alimentares. Entre elas, salientam-se a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), a hibridação quantitativa “Dot blot”, métodos baseados em PCR e “microarrays”. Cada um destes métodos apresentam vantagens e desvantagens. A técnica de FISH permite a identificação direta e a quantificação de microrganismos em amostras ambientais e, devido à sua capacidade de medir com precisão os indivíduos, representa o “padrão ouro”. Contudo, é uma técnica demasiado lenta para análises de rotina. Os métodos baseados em PCR, permitem identificar e quantificar organismos não-cultiváveis, são métodos rápidos, simples e sensíveis. No entanto, são suscetíveis de contaminação, podem ser inibidos pela presença de substâncias orgânicas ou metais pesados e não permitem discriminar entre células viáveis e não-viáveis (CATALAN et al., 1997, LESKELÄ et al., 2005, RAUTIO et al., 2003, ROWAN et al., 2005). No caso dos “Dot blots”, as

desvantagens prendem-se com a necessidade de equipamentos caros e a morosidade e trabalho das técnicas (DE MORAES et al., 2010, RAUTIO et al., 2003, ROWAN et al., 2005).

No entanto, estas técnicas não têm sido aplicadas para uso rotineiro, devido à necessidade de reagentes e equipamentos dispendiosos, além de profissionais experientes (HUHTAMELLA et al., 2006). Numerosas metodologias de detecção estão disponíveis mas, independente da abordagem, questões importantes precisam ser respondidas antes de sua inclusão em experimentos rotineiros. Estas incluem a exatidão, sensibilidade, robustez, frequência e custo dos testes (FREITAS et al., 2006, TSUI et al., 2011). Assim, cada vez mais, o desenvolvimento de novos métodos para a rápida, sensível e confiável quantificação de *RNA* tem recebido atenção crescente.

1.2 Detecção por hibridação em sanduíche

O ensaio de hibridação em sanduíche (SHA), desenvolvido por WICKS et al. (1998), constitui uma alternativa aos métodos habituais de detecção de microrganismos, sendo uma técnica sensível e específica para a detecção de moléculas alvo de *RNA*. Este método baseia-se na detecção de eventos de hibridação entre duas sondas de oligonucleótidos específicas, a sonda de captura e a de detecção, e os ácidos nucleicos alvo (RAUTIO et al., 2003). Este método permite a quantificação específica de *rRNA* alvo a partir de preparações brutas de *RNA* (ROWAN et al., 2005). Com esta técnica, a sonda de captura é usada para imobilizar a sequência alvo e a sonda de detecção é marcada com um marcador detetável, como se mostra na Figura 1.

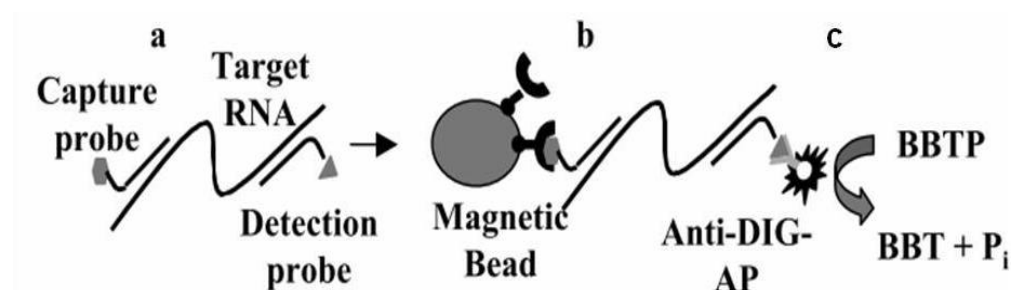


Figura 1. Princípio do ensaio de hibridação em sanduíche. Na solução de hibridação a sonda de captura marcada com biotina e a sonda de detecção com digoxigenina (DIG) são as primeiras hibridadas com o *RNA* alvo (a) seguido por imobilização híbrida de esferas

magnéticas e enzima de detecção fosfatase alcalina conjugada com anti-DIG (b), a fosfatase alcalina cliva BBTP (2'-[2-benzotiazolil]-6' hidroxibenzotiazol fosfato, Attophos®) para fosfatase inorgânica (Pi) e BBT (2' [2-benzotiazolil]-6-hidroxibenzotiazol), gerando fluorescência. Fonte: RAUTIO et al. (2003).

As sondas, como as utilizadas nesta técnica, podem ser desenhadas por computador a partir de pesquisas de “assinaturas” dos organismos-alvo. Estas regiões alvo podem ser específicas em níveis diferentes, dependendo da variabilidade filogenética das sequências da molécula-alvo. A sonda é constituída por uma sequência curta de nucleótidos, que são específicos para uma linhagem ou várias espécies, géneros ou classificações taxonómicas superiores (TSUI et al., 2011).

Diferentes ensaios de hibridação em sanduíche (SHAs) têm sido amplamente utilizados na detecção de ácidos nucleicos de microrganismos. Para além da detecção, esta técnica permite a quantificação de microrganismos, tendo uma sensibilidade comparável a do PCR em tempo real (SAINI et al., 1999). Como pode ser utilizada em extratos celulares sem purificação prévia, o método torna-se mais rápido. Para além da rapidez, simplicidade e pelo facto de todos os componentes deste sistema de detecção poderem ser obtidos comercialmente e não ser necessário equipamento específico, este método torna-se bastante atrativo para aplicação industrial (LESKELÄ et al., 2005, SAINI et al., 1999).

Após a incubação, uma etapa de lavagem é fundamental para discriminar os organismos-alvo dos não-alvo. As sondas que não se ligarem a uma sequência de *rRNA* serão lavadas, resultando em um sinal fluorescente exclusivamente de organismos-alvo. Por isso, o sinal da sonda está correlacionado com o teor de ribossomas, e por conseguinte, aumenta nas células com maior atividade metabólica (TSUI et al., 2011).

Ao contrário dos ensaios tradicionais citados, todos os componentes deste sistema de detecção podem ser obtidos comercialmente, nenhum equipamento altamente especializado é necessário e o ensaio pode ser usado e adaptado sem significativa experiência em biologia molecular (WICKS et al., 1998). Como nenhuma purificação ou separação do *RNA* é necessária, as amostras de uma ampla variedade de fontes podem ser analisadas e as possíveis perdas de alvo durante tais procedimentos é eliminada. O ensaio pode ainda processar um grande número de amostras simultaneamente.

1.3 Detecção de fungos patogénicos – *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

A detecção rápida e precisa de fungos patogénicos ou produtores de toxinas é muitas vezes essencial para a vigilância e implementação de uma estratégia de gestão da produção de alimentos. O desenvolvimento de ensaios de detecção direta de fungos constitui um desafio, uma vez que estes microrganismos podem existir como complexos de múltiplas espécies ou em concentrações muito baixas, podem existir diferenças moleculares dentro das espécies e, para além disso, existem fungos não-cultiváveis e não esporulares, que não podem ser detetados pelas técnicas convencionais (TSUI et al., 2011). Assim, a utilização de técnicas moleculares nestes estudos é cada vez mais imprescindível.

Ensaio microbianos *in vivo* com a utilização, principalmente, de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem-se mostrado muito adequados na determinação da presença de fungos em geral, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados a outros organismos vivos, já que esta espécie é considerada um organismo modelo eucariótico. Organismos modelo são úteis para a investigação, pois constituem uma forma fácil e uniforme de desenvolver e otimizar métodos. Tais organismos devem ser representativos dos seres vivos para os quais servem de modelo (KARATHIA et al., 2011). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos modelo de eucariotos mais amplamente utilizado e conhecido. Além disso, o conhecimento da biologia da espécie-alvo auxilia a conceção e determinação da amostragem e metodologia de extração ideais (TSUI et al., 2011).

1.4 Motivação e Objetivos

Os métodos clássicos para a detecção de microrganismos na indústria estão a ser lentamente substituídos, pelo que é de extrema importância estudar a aplicabilidade de métodos moleculares nas empresas, e também simplificar os procedimentos laboratoriais (HUHTAMELLA et al., 2006).

Recentemente, a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) que estabeleceu o Programa de Verificação de Tecnologia Ambiental (ETV) aprovou uma nova metodologia, de modo a facilitar a implantação de empresas inovadoras ou tecnologias ambientais melhoradas e avaliou o desempenho de novas tecnologias, através do desenvolvimento de planos de teste

que respondam às necessidades das partes interessadas. O Centro de AMS (Advanced Monitoring Systems) avaliou o desempenho de uma tecnologia rápida de detecção de fungos, o Mycometer®, que é baseado na detecção fluorogénica de atividades enzimáticas encontradas predominantemente num grupo taxonómico de organismos (STENNER et al., 2012).

O objetivo geral do presente estudo foi o desenvolvimento de um método rápido e confiável para a quantificação do *RNA* de fungos através da hibridação em sanduíche tradicional, com o intuito de tornar o método viável para uso industrial. O método foi desenvolvido de modo a que todos os componentes pudessem ser obtidos comercialmente e de forma a ser adaptado a utilizadores sem experiência significativa em Biologia Molecular. A influência de diferentes parâmetros como concentração das sondas, dos componentes da solução de hibridação, os tempos das reações, quantidade de esferas magnéticas e temperaturas de hibridações foram investigadas para reduzir ruídos, otimizar o protocolo e o nível de sensibilidade do método. Por este ser um estudo que visa o conhecimento da sensibilidade do método de análise, foi utilizado um organismo alvo modelo - *Saccharomyces cerevisiae*, que é amplamente utilizada na ciência e na indústria alimentar.

2. Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

2.1 Cultura, Diluição e Quantificação Celular

A maioria dos fungos têm como necessidades nutricionais, os elementos C, O, H, N, P, K, Mg, S, Mn, Cu, Fe e Zn e a temperatura ótima situa-se entre 20 a 30 °C (DE MORAES et al., 2010). *Saccharomyces cerevisiae*, o microrganismo modelo escolhido, cresceu aerobicamente a 26 °C em ágar YGC solidificado (Yeast Extract Glucose Cloranfenicol Agar, FIL-IDF - Merck), durante 60 horas. A biomassa celular foi removida de três placas diretamente da superfície do meio e ressuspensas em diferentes diluentes, dependendo do método de extração utilizado. Foi então realizada a diluição seriada de 1:10 a partir da primeira suspensão (Figura 2).

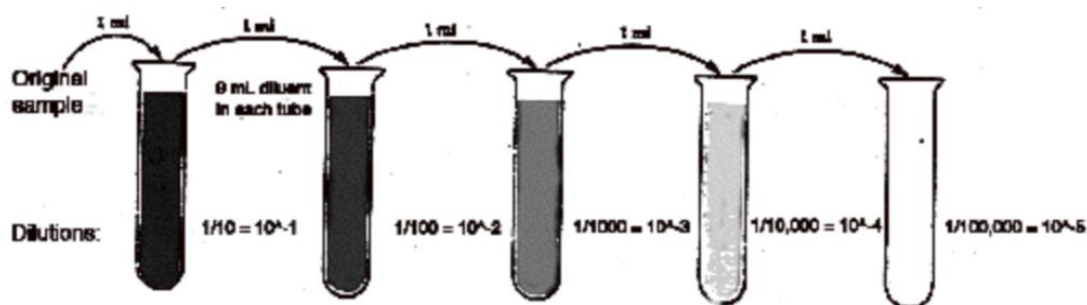


Figura 2. Demonstração de uma diluição seriada típica. Fonte: (BRADY), modificado por JBM (2008).

Foi realizada a contagem do número total de leveduras (NTL) de cada diluição, numa câmara de Neubauer, também conhecida como hemacitômetro ou câmara de contagem. Esta consiste numa lâmina de microscopia, mais alta do que uma lâmina normal, que contém duas câmaras, cada uma com uma grade microscópica gravada sobre a superfície do vidro (LUCARINI et al., 2004, ROUGE, 2002). As câmaras são cobertas com uma lamela de vidro que repousa sobre pilares, situados a exatamente a 0,1 mm acima da base da câmara. Assim, o volume de fluido acima de cada quadrado da grade é conhecido com precisão.

A utilização da câmara de Neubauer foi feita de acordo com a descrição de ROUGE (2002). A amostra deve ser diluída antes de carregada na câmara e o fator de diluição deve ser registado para permitir, posteriormente, a determinação da concentração. A amostra é deixada em repouso durante 2 ou 3 minutos de modo a que as células parem de derivar em torno da câmara. Como a grade completa contém nove quadrados, cada um dos quais de 1 mm^2 e a lamela repousa $0,1 \text{ mm}$ acima da base da câmara, o volume total da câmara é 9 mm^3 .

A grelha da câmara pode ser dividida em 25 quadrados, que podem ser todos contados, ou pode ser usado um padrão, como os demonstrados na Figura 3. É importante distribuir as áreas de contagem por toda a grelha, uma vez que as células podem encontrar-se mais concentradas num lado da câmara. Se forem contados, por exemplo, apenas 5 dos 25 quadrados grandes, em seguida, deve-se multiplicar esse valor por 5 para obter o número de células por área de contagem central.

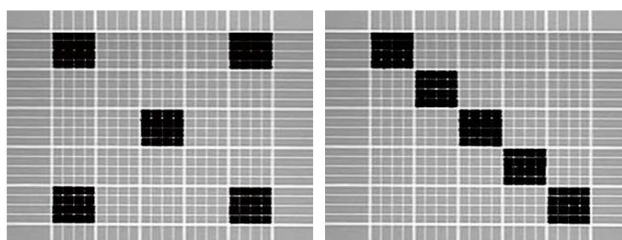


Figura 3. Exemplos de padrões de contagem que podem ser adotados.

A precisão da contagem manual utilizando este método depende de vários fatores, como a correta mistura da amostra, para que a concentração esteja homogênea e não se formem bolhas; do número de câmaras contadas e do número de células contadas (LUCARINI et al., 2004).

2.2 Extração e Quantificação de RNA

Neste trabalho, foram testados três métodos de extração de RNA de fungos, sendo o RNA extraído posteriormente quantificado, utilizando Qubit® Quantification Platform (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) que constitui uma combinação eficiente de quantificação de fluorescência sofisticada, precisa e altamente sensível, utilizando a mais recente tecnologia de iluminação e detecção de dsDNA e RNA, obtendo bons resultados, mesmo com amostras muito diluídas. O kit foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Preparou-se o Quant-It™ "Working Solution", diluindo de 1:200 o Quant-iT™ "Reagent" no

Quant-iT™ “Buffer”. De seguida, 1 µl de amostra foi adicionado a 199 µl desta mistura e submeteu-se os tubos ao vortex durante 2 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, os tubos foram lidos no fluorímetro Qubit®, sendo o cálculo da concentração de *RNA* da amostra realizado no aparelho.

Em relação aos métodos de extração de *RNA*, no método 1, as células foram extraídas diretamente da cultura (mantida em estufa por 60 horas a 26 °C) e ressuspensas num tubo de Falcon com solução de Ringer (pH 7) (Figura 4, a e b). Para a extração do *RNA*, 1ml de amostra foi colocada em tubo de 2 ml contendo 0,5 g de pérolas de vidro de diferentes diâmetros [0,1 g de esferas de vidro de 0,1 mm; 0,1 g de esferas de zircónio/sílica de 0,1 mm (Biospec Products Inc.); 0,1 g de esferas de vidro de 0,25-0,5 mm; 0,1 g de esferas de vidro de 0,75-1 mm; 0,1 g de esferas de vidro de 2,84-3,45 mm (Roth) - Figura 5, a e b]. As células foram rompidas com o homogeneizador Fast Prep®-24 (Sample Preparation System, MP Biomedicals) a velocidade de 5.5 m/s por 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 0,5 ml de fenol-clorofórmio (Fluka, BioUltra, Sigma Aldrich) de pH ácido (4-5) e o tubo foi incubado e vortexado (Vortex, V-1 Plus, BioSan Ltd), durante 5 minutos e, posteriormente centrifugado (1-14, Sigma Laborzentrifugen) a 14000 g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf.

No método 2, as células foram extraídas diretamente da cultura e ressuspensas num tubo de Falcon com solução de Ringer (Merck) de pH 7. Para a extração do *RNA*, 1 ml de amostra foi colocado num tubo de 2 ml contendo 0,5 g de pérolas de vidro de diferentes diâmetros (assim como no método 1). As células foram rompidas com o homogeneizador Fast Prep®-24 à velocidade de 5.5 m/s durante 30 segundos, sendo depois adicionados 0,5 ml de fenol-clorofórmio de pH ácido (4-5). O tubo foi incubado e vortexado durante 5 minutos e centrifugado a 14000 g durante 5 minutos. Adicionaram-se 650 µl de isopropanol (Sigma) frio e inverteu-se o tubo 10 vezes. Colocou-se a amostra a -20 °C durante 30 minutos e de seguida foi centrifugada a 14000 g por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi reidratado com 100 µl de água ultrapura (DEPC-treated water, Ambion).

No método 3, utilizou-se um kit para extração de *RNA* de solos, de acordo com as instruções do fabricante (FastRNA™ Pro Soil-Direct Kit, MP Biomedicals). Foram realizadas diluições seriadas a partir das células extraídas diretamente da cultura e ressuspensas na solução de lise do kit. As amostras foram processadas em FastPrep® a 6.0 m/s durante 40 segundos, centrifugados a 14000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionaram-se 750 µl de

fenol:clorofórmio (1:1) e vortexaram-se os tubos durante 10 segundos. As amostras foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a dissociação de nucleoproteínas e aumentar a pureza do *RNA*, sendo depois centrifugadas a 14000 g durante 5 minutos a 4 °C (Sorvall, Biofuge Primo R, ThermoFisher Scientific). A fase aquosa superior foi transferida para um novo frasco sem perturbar a interfase formada e adicionaram-se 200 µl de solução “Inhibitor Removal”, invertendo-se depois os frascos cinco vezes, para homogeneização completa da mistura. A amostra foi então centrifugada a 14000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo onde foram adicionados 600 µl de isopropanol frio. Inverteram-se as amostras cinco vezes e colocaram-se a -20 °C durante pelo menos 30 minutos. Depois deste procedimento, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 15 minutos à 4 °C, removendo-se o sobrenadante e secando-se o *pellet* durante 5 minutos a temperatura ambiente. De seguida, ressuspendeu-se o *pellet* em 200 µl de água DEPC e adicionaram-se 10 µl de RNAMATRIX® “Slurry” e 600 µl de RNAMATRIX® “Binding Solution”. Os tubos foram invertidos por 5 minutos e micro centrifugados (QikSpin, Edwards Instrument Co) durante 15 segundos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 500 µl de RNAMATRIX® “Wash Solution”. A amostra foi novamente micro centrifugada e o sobrenadante descartado, de modo a remover qualquer resíduo de solução de lavagem restante. O *pellet* foi novamente seco durante 5 minutos, ressuspendido completamente duas vezes, por vortex, em 50 µl de água DEPC, incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente e micro centrifugado. Foram feitas duas alíquotas de cada amostra e guardadas a -80 °C.

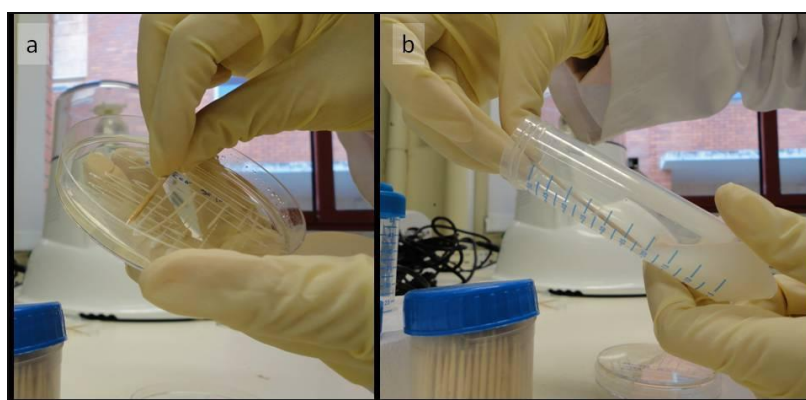


Figura 4. Extração de células de *Saccharomyces cerevisiae* da superfície do meio de cultura, com palitos estéreis (a) e ressuspendidas em Solução de Ringer (b).

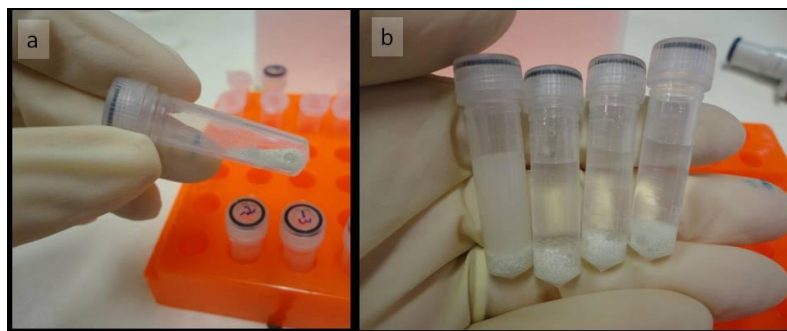


Figura 5. Demonstração de 0.5 g de esferas de vidro em tubos de 2 ml (a), para rompimento das células de levedura de diferentes diluições em homogeneizador FasPrep[®] (b).

2.3 Ensaio de Hibridação em Sanduíche (SHA)

No presente estudo, foi usado o formato primário do ensaio desenvolvido por WICKS et al. (1998) com poucas modificações para a detecção e quantificação de fungos, com *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

2.3.1 Sondas

Foram modificadas sondas específicas para fungos, usando os subprogramas PROBE DESIGN e MATCH PROBE do software ARB. As sondas foram testadas diante um banco de dados portador de 368.000 sequências. A análise da seqüência através do GenBank e do banco de dados ARB, resultou em reconhecimentos específicos das sequências de *rRNA* 18S de fungos de toda a divisão Eumycota, que abragem a grande maioria dos fungos (Figura 6).

As sondas de captura e detecção foram sintetizadas por Integrated DNA Technologies (EUA). A sonda de captura é ligada a uma molécula de biotina e a sonda de detecção foi marcada com kit de rotulagem de oligonucleótidos DIG, 2^a geração (Roche Diagnostocs, Mannheim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, onde os oligonucleótidos são enzimaticamente rotulados na sua extremidade 3' com terminal transferase por incorporação de uma digoxigenina dideoxiuridina-trifosfato (DIG-ddUTP). Neste trabalho, 4.5% da sonda de detecção sintetizada (100µM), foi adicionada em 36.4% de água ultrapura, sendo posteriormente adicionados no tubo de PCR, 18.2% de "Reaction

Buffer”, 18.2% de CoCl_2 , 4.5% de DIG-dUTP, 4.5% de dATP e 4.5% de 400U “terminal transferase”. A solução obtida foi cuidadosamente misturada e incubada a 37 °C durante 15 minutos, sendo depois arrefecida em gelo. Finalmente, foram adicionados 9% de EDTA 0.2M e a solução foi mantida a -20 °C até posterior utilização.

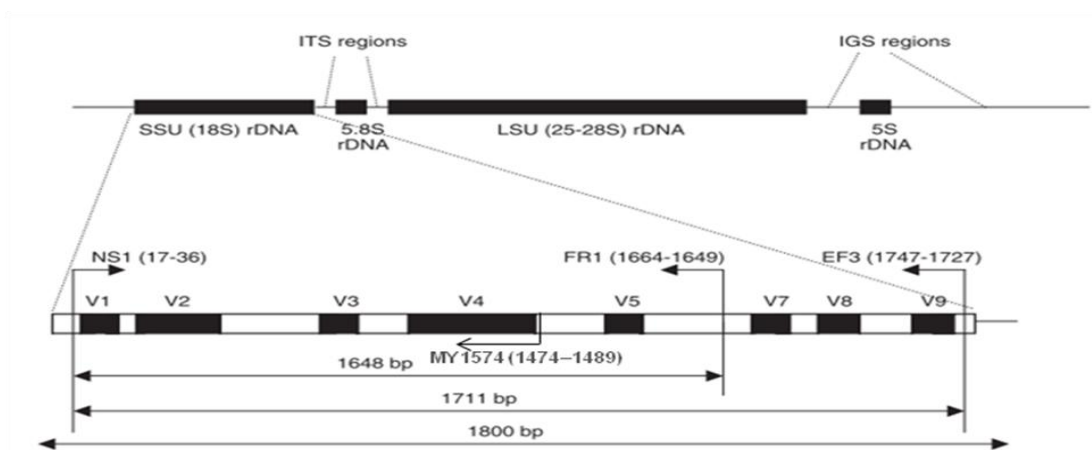


Figura 6. Esquema das sondas modificadas testadas e seus respectivos tamanhos em pares de base. Legenda: EF3, sonda de detecção; FR1, sonda de captura; MY1574, sonda de captura; bp, pares de base.

2.3.2 Hibridação

Após um passo de desnaturação do RNA (95 °C durante 10 minutos), preparou-se a solução de hibridação do ensaio em sanduíche. A solução para cada amostra consistiu de 59% de SSC 5X (Sigma), 10% de formamida (Sigma-Aldrich), 2% de Ficoll (1%), 2% polivinilpirrolidona (1% - PVP, Sigma-Aldrich), 1% de BSA (2% - Sigma), 8% de sulfato de sódio dextran (50% - Sigma) e 2% de SDS (1% - lauril sulfato de sódio, Sigma). A solução foi depois distribuída em tubos de PCR e então foram adicionadas as sondas (5% de sonda de captura marcada com biotina, 1% de sonda de detecção marcada com DIG) e as amostras (10%), para um volume final de 100µl. Foi feita a incubação a 50 °C durante 30 minutos (Figura 7). Foram efetuados dois tipos de branco, ambos contendo a solução de hibridação e as sondas. Num dos tubos foi adicionada água ultrapura e no outro, células da bactéria *Escherichia coli*, desta maneira podíamos garantir a especificidade das sondas, além de simular amostras ambientais onde naturalmente haverá presença de RNA não-fúngico. Para todas as amostras foram efetuadas três réplicas.

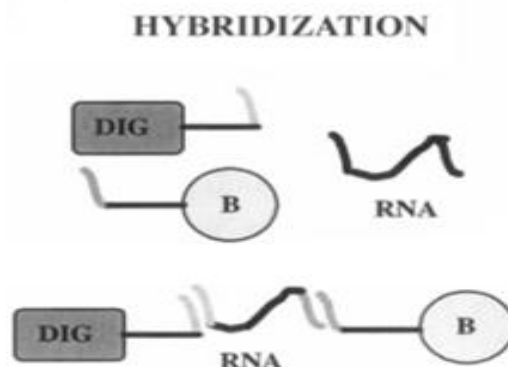


Figura 7. Representação esquemática da hibridação do RNA alvo, que ocorre a 50 °C por 30 minutos. Fonte: Rowan et al. 2005, modificado. Legenda: DIG, digoxigenina ligado a sonda de detecção; B, biotina ligada a sonda de captura; RNA, RNA alvo.

2.3.3 Captura

Antes da imobilização do produto hibridado as esferas magnéticas foram lavadas duas vezes com 100 µl de solução de lavagem (SSC 1X e SDS 0,04% p/v) e concentradas, com auxílio de uma placa magnética de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, Promega Corporation, Madison, EUA). Em seguida, 20 µl de esferas magnéticas lavadas foram adicionadas a cada amostra e incubadas a 37 °C durante 30 minutos, de modo a ocorrer conjugação do sanduíche hibridado, através da biotina presente na sonda de captura com a estreptavidina das esferas magnéticas (Figura 8), possibilitando assim a captura das sequências alvo.

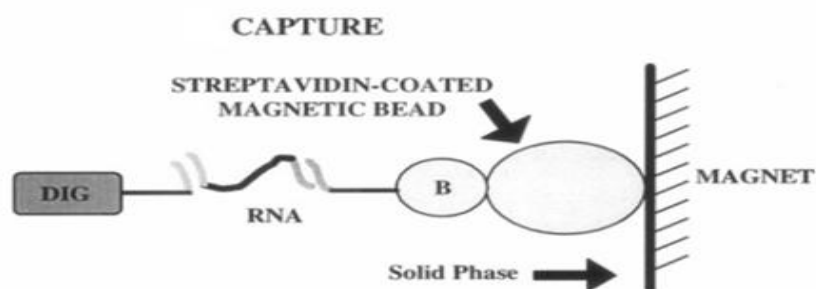


Figura 8. Representação esquemática da captura do *RNA* alvo hibridado imobilizado em uma fase sólida durante as lavagens. Fonte: Rowan et al. 2005, modificado.

2.3.4 Detecção

Para se proceder à detecção dos fungos nas amostras analisadas, estas foram colocadas num separador magnético (MagnetoPure, Chemicell), sendo adicionada solução de lavagem a 50 °C para remover as sequências não hibridadas. De modo a garantir a total remoção destas sequências, este procedimento foi efetuado duas vezes.

Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µl de enzima fosfatase alcalina (1:2000), ligada a um anticorpo anti-digoxigenina (Roche Diagnostics). As amostras foram então incubadas a 37 °C, durante 30 minutos, sendo o produto desta reação lavado com solução de lavagem, à temperatura ambiente. A lavagem foi efetuada duas vezes e o produto de reação transferido para um novo tubo e novamente lavado, descartando-se o sobrenadante. As esferas foram então ressuspensas em 1ml de substrato AttoPhos® AP Fluorescent Substrate System (Promega, Madison, WI, EUA) e incubadas a 37 °C, durante 20 minutos, a 450 rpm, quando o substrato reagia com a enzima e formava sinal fluorescente (Figura 9). Recolheu-se o sobrenadante, que foi analisado em dois espectrofluorímetros distintos. No fluorímetro 1 (FluoroMax 3, Honda Jobin-Yvon with a slit of 2 nm, NJ, EUA) foram utilizadas cuvettes de 1ml descartáveis (VWR) e os comprimentos de onda ótimos para o substrato que eram de 430 nm para excitação e 560 nm para emissão. Já no fluorímetro 2 (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) a fluorescência foi medida no suporte de leitura ideal, uma placa preta de 96 poços (Sterilin®, ThermoFisher), onde as amostras foram distribuídas aleatoriamente, os comprimentos de onda utilizados, neste caso, foram 360 ± 40 nm para excitação e 528 ± 20 nm para a emissão. Em ambos os casos foi efetuada uma curva de calibração do método.

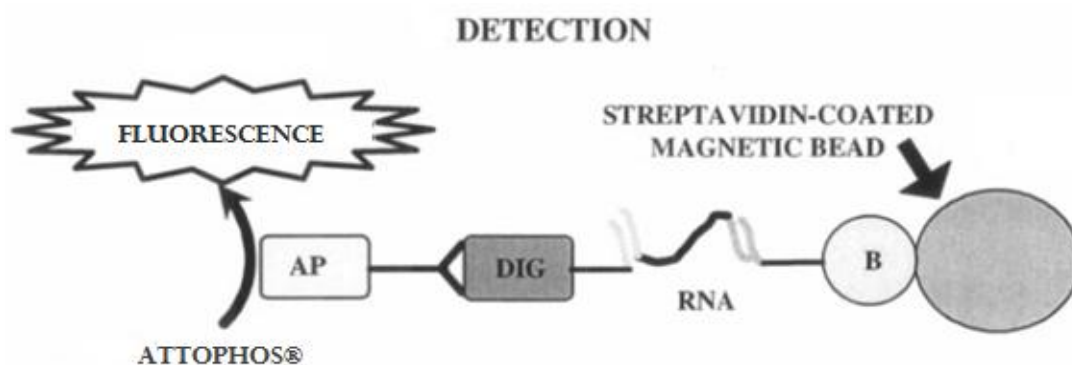


Figura 9. Representação esquemática do produto hibridado ligado ao anticorpo anti-DIG, rotulado com a enzima fosfatase alcalina, que reage com o substrato produzindo

sinal proporcional ao número de hibridados (*RNAs* alvo) presentes em cada amostra. Fonte: ROWAN et al. (2005), modificado. Legenda: AP, enzima fosfatase alcalina conjugada com anti-digoxigenina; AttoPhos[®], substrato fluorescente.

2.4 Análises Estatísticas

Os sinais de fluorescência obtidos a partir do ensaio de hibridação em sanduíche relativos às amostras diluídas seriadamente e extraídas pelo método 3 foram introduzidos em Excel, sendo criados gráficos e analisados estatisticamente. Foram calculados os valores de desvios-padrão das réplicas e realizada a regressão linear dos resultados.

3. Resultados

Resultados

3.1 Escolha do método de extração de RNA

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método de hibridação em sanduíche, assegurando a qualidade do RNA extraído, foi feita a comparação de três métodos de extração de RNA de células de leveduras cultivadas. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Total de RNA de células de *S. cerevisiae*, em µg/ml, após extração por três métodos diferentes, com quantificação realizada através de Qubit® Quantification Platform (Invitrogen).

Método	µg/ml
1	7,33
2	1,8
3	30

De acordo com os dados obtidos, o método 3 é o que consegue melhores resultados na extração de RNA, tendo sido obtidos 30 µg/ml, sendo este valor bastante superior ao que foi obtido com os métodos 1 e 2 (7,33 e 1,80µg/ml, respetivamente). Assim, foi possível optar claramente por este método, uma vez que nos outros dois métodos, parece ter havido perda de ácidos nucleicos.

3.2 Validação das diluições

As células de leveduras devidamente extraídas da cultura e diluídas seriadamente foram contadas em microscópio ótico, utilizando uma câmara de Neubauer. Posteriormente foi extraído o RNA e no final deste procedimento, cada amostra foi quantificada por Qubit®. A comparação entre o teor de células e a quantidade de RNA extraído para cada diluição, está representada na Tabela 2 e no Gráfico 1.

Tabela 2. Comparação numérica do total de células e da quantidade de *RNA* por mililitro de cada amostra.

células/ml	µg/ml
10^8	135
10^7	81
10^6	11
10^5	1
10^4	0
<i>E.coli</i>	61
H ₂ O	0

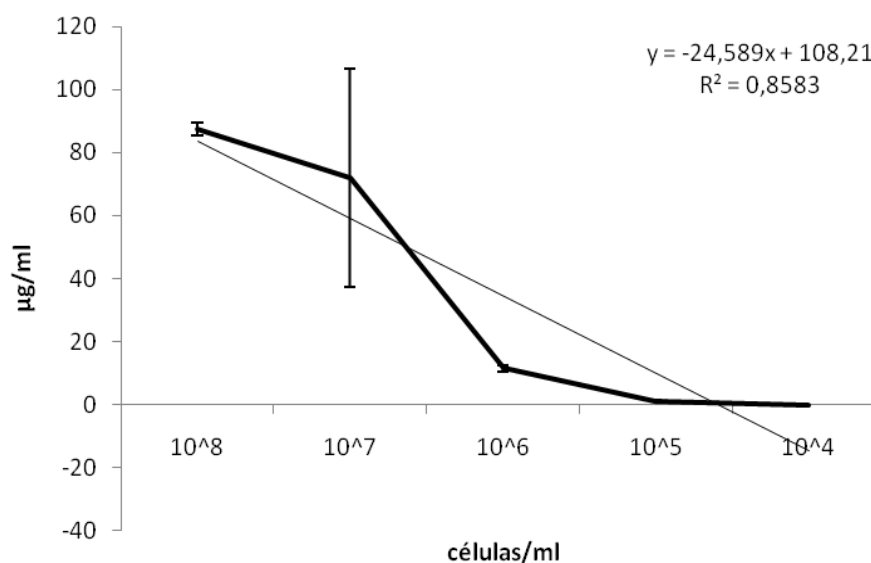


Gráfico 1. Comparação gráfica do número de células por mililitro e da quantidade de *RNA* (µg/ml) de cada diluição.

Foi possível observar, como esperado, que a quantidade de *RNA* extraído aumentou com o aumento da concentração de células, o valor de R^2 próximo a 1 confirma a tendência linear dos resultados, evidenciando o sucesso da diluição seriada.

3.3 Escolha das Sondas

Diversas sondas, tanto de captura como de detecção, foram modificadas e testadas em conjunto ou separadamente, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação das sondas testadas para a detecção de *RNA* de fungos a partir do método de hibridação em sanduíche.

	Detection-EF3 -Mod	Detection-MY1574
Capture-My-1574	Positivo	Negativo
Capture-FR1-Mod		
Capture-My-1574	Negativo	-
Capture-FR1-Mod	Positivo	Negativo

Os resultados mostraram que quando as sondas de captura My-1574 e FR1-Mod e a de detecção EF3-Mod foram utilizadas para o ensaio, formou-se um sinal fluorescente. Testaram-se as sondas de captura individualmente com a sonda de detecção EF3-Mod, e apenas para o conjunto, sonda de captura FR1 e sonda de detecção EF3 o sinal foi positivo, o que significa que este conjunto de sondas foi capaz de hibridar com o alvo. Assim, estas foram as sondas utilizadas nos ensaios de hibridação em sanduíche seguintes e suas seqüências estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências das sondas utilizadas para detecção de RNA de fungos através do ensaio de hibridação em sanduíche, onde a sonda de captura foi modificada com uma molécula de biotina e a sonda de detecção foi posteriormente rotulada com uma digoxigenina.

Sondas	Sequência
Detecção EF3-Modificada	5'-TTT AST TCC TCT AAA TSA YGB G
Captura FR1-Modificada	5'-/5BioSg//iSp9/ GAR CCA TYC AAT CGG TAS

3.4 Otimização da Temperatura de Hibridação

Diversas temperaturas foram testadas no processo de hibridação das sondas com o RNA alvo, visando otimizar esta interação. Temperaturas entre 45 e 55 °C foram utilizadas e a que mostrou melhor sinal fluorescente foi a hibridação realizada a 50 °C. Assim, esta foi a temperatura utilizada nos ensaios seguintes.

3.5 Sensibilidade de Detecção

A seguir estão representados os valores de fluorescência ajustada após o ensaio de hibridação em sanduíche (SHA), para as diversas diluições preparadas previamente. Fluorescência ajustada é média da fluorescência lida de cada réplica subtraída da fluorescência mensurada no branco (neste caso, branco contendo células de *E. coli*). O mesmo ensaio teve a leitura realizada em dois fluorímetros com condições diferenciadas.

No fluorímetro 1 (FluoroMax 3) a leitura das amostras foi realizada em cuvettes descartáveis de 1ml com comprimentos de onda ótimos para o substrato: excitação de 430 nm e emissão de 560 nm (Gráfico 2).

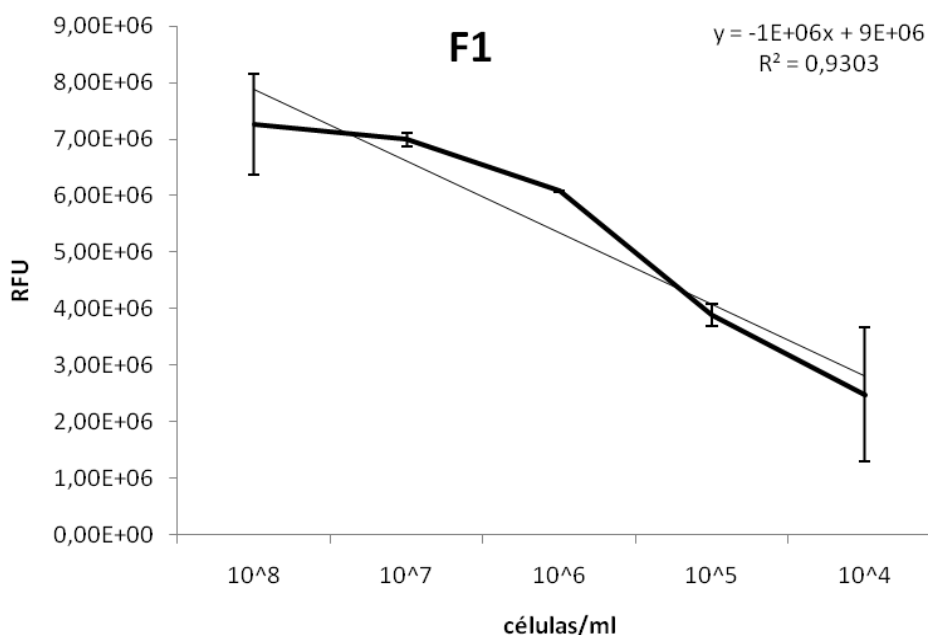


Gráfico 2. Representação gráfica dos valores de fluorescência ajustada (RFU – Relative Fluorescence Unit), mensurados no fluorímetro 1.

Podemos observar que a concentração mais baixa de células apresentou um bom sinal de fluorescência em relação ao branco, o método teve boa sensibilidade na presença de 10⁴ células por mililitros. Apesar de não se verificar um aumento de sinal proporcional ao aumento de concentração, principalmente para as concentrações mais elevadas, o valor de R² próximo de 1, indica a qualidade da curva analítica obtida, demonstrando uma relação linear entre as variáveis.

No fluorímetro 2 (Synergy 2) a fluorescência foi medida no suporte de leitura ideal, numa placa preta de 96 poços (Sterilin®, ThermoFisher), onde as amostras foram distribuídas aleatoriamente, sendo os comprimentos de onda utilizados de 360 ± 40 nm para a excitação e de 528 ± 20 nm para emissão, que não correspondem aos comprimentos de onda ótimos para o substrato.

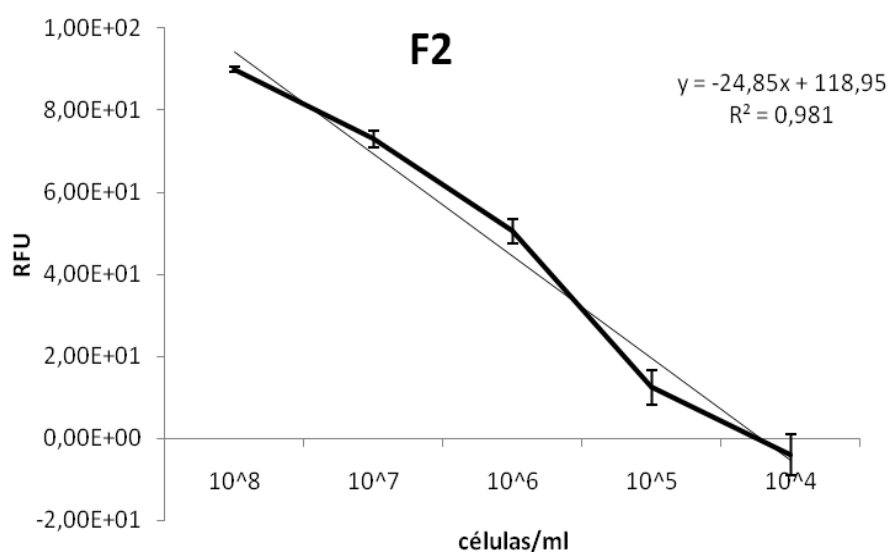


Gráfico 3. Representação gráfica dos valores de fluorescência ajustada (RFU – Relative Fluorescence Unit), mensurados no fluorímetro 2.

Neste caso, podemos observar uma detecção menos sensível, uma vez que o valor mínimo de detecção foi de apenas 10^5 células por mililitro. No entanto, houve melhor relação linear entre as variáveis. Neste fluorímetro, a diferença de sensibilidade relacionada com a utilização dos diferentes brancos ficou mais evidente, tendo o branco com organismos não-alvo permitindo maior sensibilidade do que aquando da utilização da água ultrapura como branco (resultados não mostrados).

3.6 Análise dos resultados do SHA por Qubit®

Os resultados de quantificação de *RNA*, pelo Qubit®, após o ensaio de hibridação em sanduíche, estão representados no gráfico 4.

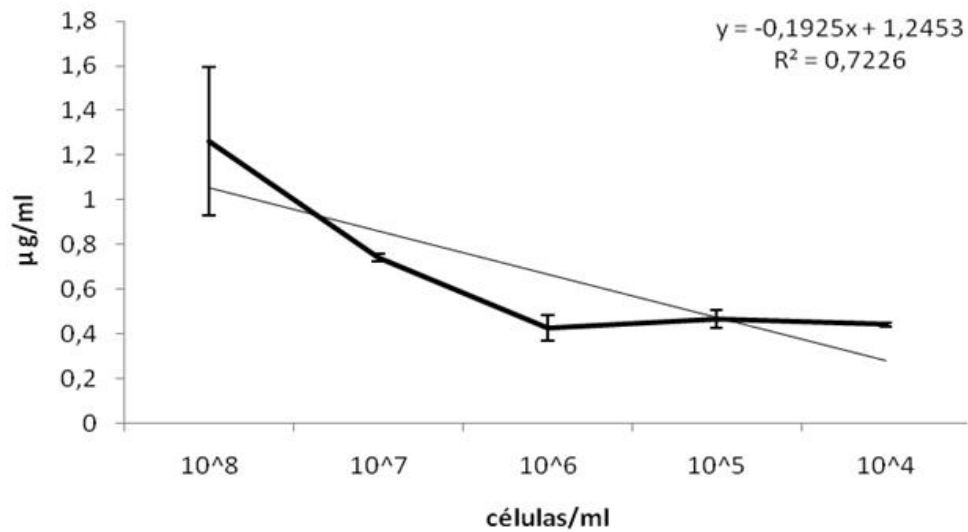


Gráfico 4. Representação gráfica da quantidade de rRNA analisada por Qubit® após o ensaio de hibridação em sanduíche.

Através da análise dos resultados obtidos, pudemos constatar que, o método é sensível, apesar de o valor de R^2 , nos confirmar a não linearidade dos resultados quando analisados desta maneira.

Este dado é importante pois nos permite estimar a quantidade de rRNA detetada em cada amostra. Sendo este um dos grandes desafios deste ensaio, já que a quantidade de rRNA depende não somente da concentração de células mas também do estado fisiológico do microrganismo em questão.

4. Discussão

Discussão

De modo a assegurar uma boa extração de ácidos nucleicos, é essencial que os métodos utilizados na extração e preparação da amostra, bem como a estratégia de amostragem utilizada sejam adequados à amostra em estudo e permitam um nível de lise celular adequada (TSUI et al., 2011). Os resultados obtidos mostram claramente que a utilização do método de extração 3 em células de *Saccharomyces cerevisiae*, com 60 horas de crescimento, originou maior quantidade de *RNA* extraído do que os outros métodos testados. Assim, este método assegura a qualidade do trabalho de quantificação posterior.

Os limites de deteção obtidos neste trabalho foram de 10^4 células/ml no fluorímetro 1 e 10^5 células/ml no fluorímetro 2 e permitem considerar a sensibilidade do método testado satisfatória. Contudo, ainda há necessidade de otimizações, com o intuito de reduzir o desvio padrão apresentado.

A deteção de níveis baixos de hibridação é alcançada por meio do sistema de teste enzimático, resultando em uma tecnologia sensível, prática e rápida que pode ser diretamente empregue em amostras não purificadas (WICKS et al., 1998). O facto do marcador quimioluminescente poder ser eficazmente monitorizado em amostras altamente diluídas dá à técnica sensibilidade consideravelmente maior do que pode ser conseguido usando reações imunológicas diretamente quantificáveis (WOODHEAD et al., 1985).

Para além de uma boa extração de *RNA*, é também necessário assegurar que as condições em que é realizado o ensaio são as melhores, de modo a obter o mínimo ruído possível e um nível de sensibilidade elevado. Num estudo realizado por ROWAN et al. (2005) foi utilizada uma ampla gama de controlos negativo, de modo a garantir que o sinal obtido durante o ensaio era devido à interação específica das sondas com o *rRNA* alvo. Tal como neste estudo, também neste trabalho se verificou que o controlo negativo com água apresentou maior ruído do que o controlo com o *rRNA* não-alvo (*E. Coli*) (dados não mostrados). Assim, verificamos que o método de hibridação em sanduíche funciona melhor na presença de outros microrganismos que não o organismo alvo, uma vez que a presença de *RNA* (alvo ou não-alvo) não permite a ligação das sondas às esferas paramagnéticas, diminuindo assim o ruído da reação. Deste modo, esta metodologia pode ser utilizada, com sucesso, na análise de amostras ambientais.

No entanto, de acordo com este mesmo autor (ROWAN et al., 2005), o limite de deteção de *rRNA* de *E. coli* purificado foi inferior ao de amostras ambientais. Para amostras puras, 10^3 a 10^4 células de *E. coli* foram detetadas e para as amostras de lodo-

ativado de 10^4 a 10^5 células bacterianas foram detetadas, uma razão para isso pode ser a natureza mais complexa destas amostras, o que pode levar à problemas como a ligação das sondas ou com a extração de *RNA*.

A temperatura a que ocorre a reação de hibridação também desempenha um papel fundamental na melhoria da especificidade da reação e na redução do ruído. Segundo um estudo realizado por ROWAN et al. (2005), a temperatura de 50 °C melhorava a sensibilidade do método, aumentando significativamente o sinal obtido. Neste trabalho, tal como no estudo anteriormente referido, a temperatura de hibridação de 50 °C também mostrou ser a mais eficaz (dados não mostrados).

O SHA aqui descrito constitui um método interessante, com potencial para a detecção de contaminantes, a precisão é a principal limitação do SHA aqui apresentado, HUHTAMELLA et al. (2006) afirmou que em seus ensaios a maior limitação foi a sensibilidade. A baixa sensibilidade é, muitas vezes, devida a uma relação sinal-ruído baixa. Assim, uma redução do ruído e uma melhoria na intensidade do sinal devem melhorar a sensibilidade do método (ROWAN et al., 2005). O ruído detetado nas amostras pode depender do substrato utilizado. Segundo o fabricante do substrato AttoPhos[®], a presença do anião BBT conduz a níveis mais baixos de ruído, melhorando a sensibilidade de detecção de fluorescência, o que é potencializado quando os valores dos comprimentos de onda mais favoráveis são usados.

As sondas constituem outro fator determinante no sucesso do ensaio de hibridação em sanduíche. ROWAN et al. (2005) examinaram a complementaridade de sondas de captura e detecção, tendo-se verificado que as sondas não hibridam entre elas nas condições do ensaio. No entanto, o sinal do controlo negativo sem *RNA* era frequentemente mais elevado do que o sinal a partir de reações contendo moléculas de *rRNA* alvo (10^8 - 10^9), ou seja, a presença de qualquer *RNA* (seja alvo ou não-alvo) na reação aparentemente não permite ligação da sonda às esferas paramagnéticas, levando à um menor sinal de fundo.

LESKELÄ et al. (2005) testaram quatro tipos de hibridação em sanduíche e o menor limite de detecção foi obtido usando uma sonda de detecção marcada com DIG, uma sonda de captura marcada com biotina e o *rRNA* 16S de *Legionella pneumophila* como alvo, semelhante ao método utilizado no presente estudo com o *rRNA* 18S de *S. cerevisiae* como alvo. LESKELÄ et al. (2005) obteve elevada sensibilidade de seus ensaios através da modificação da química das sondas e das modificações das condições de hibridação. Contudo, para SMALL et al. (2001), os métodos químicos de rotulagem e a sonda de

deteção distal foi ineficaz, independentemente da temperatura de hibridação, o tempo, ou as composições do tampão.

Foi relatado por LESKELÄ et al. (2005), ROWAN et al. (2005) e SMALL et al. (2001) que um aumento de 10 vezes da sensibilidade do sistema foi obtido quando se diminuiu a distância entre a sonda de deteção e a sonda de captura (de 100 para 5 pb) e quando sondas menores foram utilizadas, o que pode ser devido ao fato de as posições internas se encontrarem menos expostas à degradação por exonucleases, à cinética mais rápida de hibridação e a interações com estruturas secundárias, que facilitam o acesso à região de hibridação. Porém, sondas maiores podem garantir maior especificidade de deteção do alvo.

Nos trabalhos de HUHTAMELLA et al. (2006), onde foi realizado o ensaio de hibridação em sanduíche na deteção de bactérias em amostras de cervejarias, o limite de deteção foi de aproximadamente 5×10^4 a 5×10^5 células, dependendo das sondas aplicadas. Observou-se também que a utilização de elevadas concentrações de qualquer lisado celular ou *RNA* total provoca uma diminuição do sinal de fluorescência, devido à formação de ligações inespecíficas. RAUTIO et al. (2003) notaram o mesmo efeito, quando a quantidade de lisado celular bruto aumentou o sinal começou a diminuir, principalmente quando foram utilizadas mais de $2,5 \times 10^8$ células de levedura para a extração de *RNA*. No estudo de SAINI et al. (1999) os extratos não diluídos não amplificaram ou foram mal amplificados, aparentemente devido a alguns inibidores presentes nas soluções. No entanto, os autores concluíram que o efeito inibitório de componentes presentes na preparação não diluída é reduzido por diluição. Contrariamente, nos estudos de LESKELÄ et al. (2005), verificou-se que as concentrações do alvo maiores do que 1 fmol (6×10^8 moléculas de 16S rRNA e aproximadamente $8,8 \times 10^4$ células bacterianas (*Legionella*)) estavam num intervalo linear e que, para as concentrações abaixo de 1 fmol, o ruído aumentou, provavelmente devido a ligações inespecíficas de sondas e outros componentes do ensaio. No presente estudo verificamos que o sinal da amostra com 10^8 células/ml foi menor do que o esperado.

Na tentativa de baixar a sensibilidade ROWAN et al. (2005) verificaram que um aumento na frequência das lavagens resultava numa maior variação na intensidade do sinal obtido (por exemplo, os coeficientes de variação foram 7,4% para 5 lavagens e 47% para 15 lavagens), provavelmente devido a uma perda de esferas magnéticas durante o processo. Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que quando foi realizada a pipetagem das amostras durante a lavagem o sinal diminuiu consideravelmente (resultados não demonstrados). Os autores recém-citados (RAUTIO et al., 2003, ROWAN

et al., 2005, WICKS et al., 1998) afirmaram ainda que a utilização de agentes bloqueadores na solução de hibridação (SSC, Ficol, PVP, BSA), como os utilizados neste trabalho, é outro modo de reduzir as ligações inespecíficas, onde moléculas poliméricas bloqueiam potenciais sítios de ligação não específica, diminuindo assim o ruído da reação.

Neste estudo, o tempo necessário para o ensaio em sanduíche, da preparação da solução de hibridação à leitura da fluorescência foi de cerca de três horas. No entanto, segundo RAUTIO et al. (2003), esse tempo de processamento poderia ser ainda mais reduzido. No ensaio de WICKS et al. (1998) o tempo total de procedimento podia ser de 5 a 18 horas, dependendo da faixa de sensibilidade exigida. Em um período de 5 horas a detecção foi de 10^{12} - 10^8 moléculas de *rRNA*. Já em um período de 18 horas, estendendo-se o tempo de incubação do substrato entre 10^{11} e 10^7 moléculas foram determinadas.

A auto fluorescência dos fungos pode produzir falsos sinais positivos de fluorescência. Um exame de fluorescência realizado por microscopia confocal a laser revelou que muitos fungos de água doce emitem, naturalmente, auto fluorescência verde (BASCHIEN et al., 2001), e, conseqüentemente, uma sonda marcada com fluoróforo verde não poderia ser utilizada. Assim, é importante verificar se há auto fluorescência de organismos alvo e não-alvo antes de selecionar o fluoróforo para a marcação da sonda ou o comprimento de onda do método de detecção a ser usado. As amostras ambientais e de substratos, tais como folhas, madeiras e tecidos animais também podem emitir fluorescência forte em vários comprimentos de onda ao mesmo tempo, interferindo com os sinais da sonda.

Outras limitações descritas por TSUI et al. (2011) em relação à análises de fluorescência podem incluir a auto fluorescência do substrato inerente, a permeabilidade insuficiente das paredes celulares, as ligações não-específicas das sondas, o conteúdo de ribossomas baixo. No entanto, talvez a mais importante limitação dos ensaios de *RNA* é a potencial dificuldade em correlacionar a abundância *rRNA* com o número celular, que deve-se ao fato de o número de ribossomas poder variar entre espécies diferentes e também com a taxa de crescimento ou estado fisiológico de um organismo. Deste modo, a quantidade de *rRNA* pode refletir a atividade dos organismos, em vez de o número de organismos (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

Uma das grandes vantagens desta metodologia, para a aplicação prática, é a possibilidade de ser efetuada diretamente a partir de lisados celulares brutos, em contraste com outros métodos, como a amplificação por PCR, que exigem a remoção de compostos inibitórios. Assim, a perda do *RNA* alvo durante um procedimento de purificação pode ser evitada, devido à manipulação mínima da amostra.

O SHA, que aqui foi baseado no *rRNA* 18S como alvo, deteta apenas células viáveis, e é, portanto, adequado para a avaliação de risco de organismos patogénicos. A utilização de duas sondas para cada alvo, reduz o risco de resultados falso-negativos, assegurando a correta deteção (TSUI et al., 2011). O SHA permite também uma estimativa de quantificação das células-alvo, constituindo assim, uma alternativa relativamente sensível e rápida para diagnósticos de rotina (LESKELÄ et al., 2005).

5. Conclusão

Conclusão

O SHA pode ser facilmente adaptado a diferentes sistemas de leitura, tais como detecção de fluorescência (LESKELÄ et al., 2005, RAUTIO et al., 2003) e potenciometria, onde nem as condições de ensaio, nem as sondas precisam ser alteradas, a única diferença é a reação final. Sem perder muita sensibilidade, o SHA pode ser também combinado com outros sistemas de visualização, tais como peroxidase / tetrametilbenzidina. O tempo de análise, bem como a intensidade de trabalho do SHA pode ser ainda mais reduzido com a utilização de robôs de pipetagem ou plataformas automatizadas de análise de fluidos. Em futuras aplicações, podem ser utilizadas diferentes sondas, em conjunto, para detecção de organismos em ensaios *multiplex* (HUHTAMELLA et al., 2006).

No presente trabalho, a primeira etapa focou-se no desenvolvimento das sondas para detecção específica de fungos e na implementação de um protocolo de hibridação. Para a realização desta etapa utilizou-se como controlo positivo *RNA* extraído de culturas puras de *S. cerevisiae*. O objetivo foi atingido com sucesso, tendo sido possível estimar a concentração de *RNA* e o número de células fúngicas nas amostras.

Tendo em conta o contexto global do projeto, o objetivo seguinte foi o desenvolvimento de um protocolo simples e rápido, tendo-se desenvolvido um protocolo com duração média de 3 horas, que foi testado em diversas diluições de culturas puras de fungos. Os resultados obtidos vieram de encontro às expectativas em relação ao nível de sensibilidade deste método. No entanto, são ainda necessários alguns melhoramentos, no que diz respeito a reprodutibilidade dos ensaios.

6. Perspetivas Futuras

Perspetivas Futuras

Na continuação futura deste trabalho, visando melhorar consideravelmente a sensibilidade, bem como a reprodutibilidade do método, o sistema SHA desenvolvido será adaptado para o ensaio em sanduíche com detecção potenciométrica das hibridações. Esta metodologia consiste em aderir nanopartículas de prata à sonda de detecção através de uma ligação estreptavidina-biotina. Após o passo de lavagem, as nanopartículas serão analisadas potenciometricamente (Figura 10).

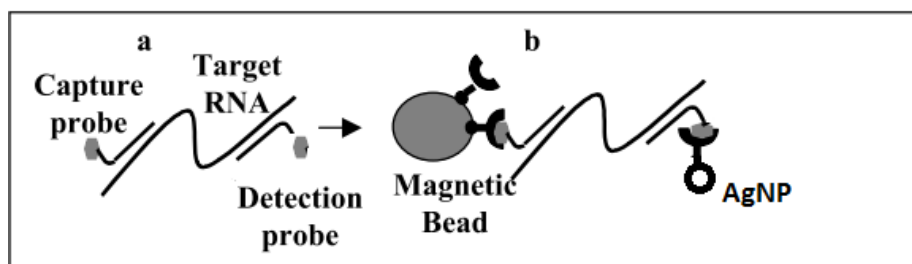


Figura 10. Esquema proposto para o ensaio em sanduíche com detecção potenciométrica das hibridações. Fonte: (RAUTIO et al., 2003), modificado. Legenda: AgNP, nanopartícula de prata.

O processo de calibração do elétrodo já está a decorrer, e o resultado preliminar obtido está representado no Gráfico 5.

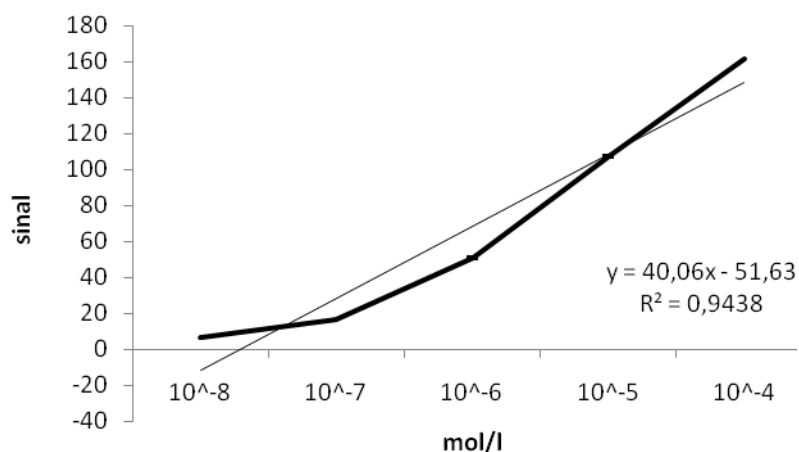


Gráfico 5. Representação gráfica dos valores obtidos de diversas concentrações de AgNP através de avaliação potenciométrica.

O SHA tem sido utilizado com sucesso como base para sistemas de detecção eletroquímica ou fluorescente. Um número de aplicações recentes sugerem que a detecção eletroquímica com uma estação controlada por computador miniaturizado numa solução fluida, contendo um chip elétrico pode ser uma ferramenta atraente para a análise de contaminantes e toxinas em diversas áreas.

Apesar das novas tecnologias que estão disponíveis, os desafios permanecem para detecção rápida de fungos não-cultiváveis e outros microrganismos *in situ*, em diferentes ambientes. Em alguns substratos, antigos ou processados, a amplificação enzimática, como ocorre nas reações de PCR pode falhar, devido à alteração dos ácidos nucleicos (degradação, modificação química) ou à presença de inibidores. Assim, a utilização de um método não-enzimático, para detecção específica de microrganismos, pode evitar testes de amplificação morosos, caros e inconclusivos (FEUILLIE et al., 2011). De acordo com WOODHEAD et al. (1985), a especificidade da reação imune significa que a análise pode ser realizada em misturas complexas. Servindo também como uma nova oportunidade para a investigação e detecção molecular no campo da biologia evolutiva e ecologia molecular, e ainda na detecção de alimentos fraudados e estudos forenses.

Existe um grande interesse, especialmente na indústria alimentar, para substituir os métodos analíticos de longa duração por métodos mais específicos e ensaios independentes de cultivo. Portanto, métodos desenvolvidos num ambiente de laboratório tem que ser simplificado, o trabalho e os instrumentos devem ser minimizados sem perda de qualidade. O método desenvolvido neste estudo é simples e rentável, outra vantagem significativa do SHA é sua flexibilidade: para além da análise de *RNA* aqui descrita, o SHA pode ser adaptado para a detecção de alvos diferentes, tais como *DNA* e proteínas, com apenas pequenas modificações no ensaio.

7. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

BASCHIEN, CHRISTIANE; MANZ, WERNER; NEU, THOMAS R.; SZEWZYK, ULRICH - Fluorescence in situ Hybridization of Freshwater Fungi. Internat. Rev. Hydrobiol. Vol. 86 (2001), p. 371–381.

BRADY, C.W. - Dilutions and dilution calculations. Adapted and significantly modified by JMB (2008): Unpublished. University of Wisconsin, Whitewater. Disponível em: <<http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/m140/syllabus/week/handouts/m140.7.1.htm>>.

CATALAN, V.; GARCIA, F.; MORENO, C.; VILA, M.J.; APRAIZ, D. - Detection of Legionella pneumophila in wastewater by nested polymerase chain reaction. Res. Microbial. Vol. 148 (1997), p. 71-78.

DARZYNKIEWICZ, ZBIGNIEW; JUAN, GLORIA - Differential Staining of DNA and RNA. Current Protocols in Cytometry. Vol. 7 (1997), p. 3.1-3.13.

DE MORAES, AUREA MARIA LAGE ; PAES, RODRIGO DE ALMEIDA; DE HOLANDA, VERÔNICA LEITE - Micologia. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. ISBN 978-85-98768-41-0. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz (2010).

FEUILLIE, CÉCILE; MERHEB, MAXIME MOHAMAD; GILLET, BENJAMIN; MONTAGNAC, GILLES; DANIEL, ISABELLE; HÄNNI, CATHERINE - A Novel SERRS Sandwich-Hybridization Assay to Detect Specific DNA Target. PLoS ONE. Vol. 6(5) (2011).

FREITAS, ELAINE IBRAHIM; LEMOS, ANDERSON ALMEIDA; MARIN, VICTOR AUGUSTUS - Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. Ciência & Saúde Coletiva. Vol. 11(4) (2006), p. 1073-1083.

HUHTAMELLA, SANNA; LEINONEN, MARIKA; NIEMINEN, TIMO; FAHNERT, BEATRIX; MYLLYKOSKI, LIISA; BREITENSTEIN, ANTJE; NEUBAUER, PETER - RNA-based sandwich hybridization method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. Journal of Microbiological Methods. Vol. 68 (2006), p. 543–553.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. - *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. PLoS One. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Vol. 6, n.º 2 (2011), p. e16015.

LESKELÄ, TARJA; TILSALA-TIMISJÄRVI, ANU; KUSNETSOVC, JAANA; NEUBAUER, PETER; BREITENSTEIN, ANTJE - Sensitive genus-specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay. Journal of Microbiological Methods. Vol. 62 (2005), p. 167– 179.

LUCARINI, ADRIANA C.; DA SILVA, LEANDRO A.; BIANCHI, REINALDO A. C. - Um Sistema Para a Contagem Semi-Automática De Microorganismos. Pesquisa & Tecnologia FEI. Vol. Nº 26 (2004), p. 36-40.

MACHADO, ANGÉLICA PATRÍCIA DA SILVA - Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água. Tese de Mestrado - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, 2006.

RAUTIO, JARI; BRKEN, KIM BUNDTVIG; LAHDENPERÄ, JUHANI; BREITENSTEIN, ANTJE; MOLIN, SOREN; NEUBAUER, PETER - Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates. BioMed Centrel, Microbial Cell Factories. Vol. 2 (2003).

ROUGE, MELISSA - Counting Cells with a Hemacytometer. Disponível em WWW: <URL:<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>>.

ROWAN, A. K.; DAVENPORT, R. J.; SNAPE, J. R.; FEARNSIDE, D.; BARER, M. R.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M. - Development of a rapid assay for determining the relative abundance of bacteria. Appl Environ Microbiol. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Vol. 71, n.º 12 (2005), p. 8481-90.

SAINI, H. S.; M., SHEPHERD; HENRY, R. J. - Microwave Extraction of Total Genomic DNA From Barley Grains for use in PCR. Journal of The Institute of Brewing. Vol. 105 (1999), p. 185-190.

SMALL, JACK; CALL, DOUGLAS R.; BROCKMAN, FRED J.; STRAUB, TIMOTHY M.; CHANDLER, DARRELL P. - Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 67 (2001).

SPERANZA, M.; WIERZCHOS, J.; ALONSO, J.; BETTUCCI, L.; MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; ASCASO, C. - Traditional and new microscopy techniques applied to the study of microscopic fungi included in amber. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. (2010).

STENNER, TRACY; SONICH-MULLIN, CYNTHIA - Rapid Fungi Detection, Analysis Of Fungi in Air, Mycometer®-test. THE ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY VERIFICATION PROGRAM. (2012).

TSUI, CLEMENT K.M.; WOODHALL, JAMES; CHEN, WEN; LÉVESQUE, C. ANDRÉ; LAU, ANNA; SCHOEN, COR D.; BASCHIEN, CHRISTIANE; NAJAFZADEH, MOHAMMAD J.; DE HOOG, G. SYBREN - Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. IMA Fungus. Vol. volume 2 (2011), p. 177–189.

WICKS, BEN; COOK, DAVID B.; BARER, MIKE R.; O'DONNELL, ANTHONY G.; SELF, COLIN H. - A Sandwich Hybridization Assay Employing Enzyme Amplification for Determination of Specific Ribosomal RNA from Unpurified Cell Lysates. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. Vol. 259 (1998), p. 258–264.

WOODHEAD, J. STUART; WEEKS, IAN - Chemiluminescence immunoassay. Pure & Appl. Chem. Vol. 57, No. 3 (1985), p. 523—529.

* Este texto foi escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico